



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 201697920 U

(45) 授权公告日 2011. 01. 05

(21) 申请号 201020198882. 4

(22) 申请日 2010. 05. 19

(73) 专利权人 厦门大学附属中山医院

地址 361004 福建省厦门市思明区湖滨南路
201-209 号

(72) 发明人 张忠英 林丽蓉 杨天赐 张长弓

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所
35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/571(2006. 01)

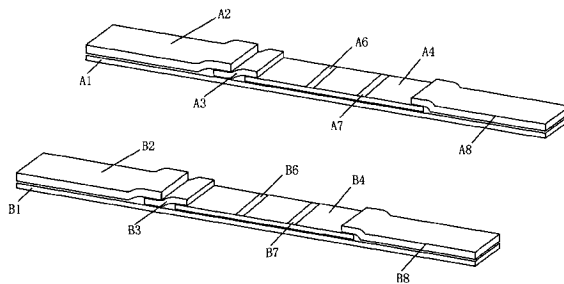
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 2 页

(54) 实用新型名称

梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条

(57) 摘要

梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条, 涉及一种梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂。设有 2 条试剂条, 2 条试剂条均设有载体板、加样垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、对照线和吸收垫; 第 1、2 条试剂条分别设有梅毒特异性 IgM 抗体检测线和特异性总抗体检测线。制备梅毒重组抗原 TPN17、TPN47; 硝酸纤维素膜的点样; 制备胶体金; 胶体金与 TPN17、TPN47 的标记; 制备免疫层析检测条。可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中梅毒特异性 IgM 抗体和特异性总抗体的检测。检测时标本量极小, 不需特殊仪器, 肉眼直接判读结果, 检测简便快速, 特异性强, 灵敏度高, 准确可靠, 成本低, 应用广泛。



1. 梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条,其特征在于设有第 1 试剂条和第 2 试剂条;

第 1 试剂条设有第 1 载体板、第 1 加样垫、第 1 胶体金垫、第 1 硝酸纤维膜、梅毒特异性 IgM 抗体检测线、第 1 对照线和第 1 吸收垫;第 1 加样垫、第 1 胶体金垫、第 1 硝酸纤维膜和第 1 吸收垫依次粘贴在第 1 载体板上表面,第 1 加样垫的一端设在第 1 胶体金垫的一端上,第 1 胶体金垫的另一端设在第 1 硝酸纤维膜的一端上,第 1 吸收垫的一端设在第 1 硝酸纤维膜的另一端上,梅毒特异性 IgM 抗体检测线和第 1 对照线依次设在第 1 硝酸纤维膜上;在梅毒特异性 IgM 抗体检测线处包被抗人 IgM 特异性片段 μ 链单克隆抗体,在第 1 对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体;

第 2 试剂条设有第 2 载体板、第 2 加样垫、第 2 胶体金垫、第 2 硝酸纤维膜、特异性总抗体检测线、第 2 对照线和第 2 吸收垫;第 2 加样垫、第 2 胶体金垫、第 2 硝酸纤维膜和第 2 吸收垫依次粘贴在第 2 载体板上表面,第 2 加样垫的一端设在第 2 胶体金垫的一端上,第 2 胶体金垫的另一端设在第 2 硝酸纤维膜的一端上,第 2 吸收垫的一端设在第 2 硝酸纤维膜的另一端上,特异性总抗体检测线和第 2 对照线依次设在第 2 硝酸纤维膜上;在特异性总抗体检测线处包被抗人 Ig 单克隆抗体或梅毒特异性抗原 TPN17 和 / 或梅毒特异性抗原 TPN47,在第 2 对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 IgG 抗体。

2. 如权利要求 1 所述的梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条,其特征在于第 1 试剂条的第 1 加样垫与第 2 试剂条的第 2 加样垫之间用玻璃纤维膜连接。

3. 如权利要求 1 所述的梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条,其特征在于所述第 1 载体板和第 2 载体板为 PVC 板。

梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条

技术领域

[0001] 本实用新型涉及一种梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂,尤其是涉及一种采用胶体金免疫层析技术 (immunochromatography) 进行的梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条及其制备方法。

背景技术

[0002] 梅毒 (Syphilis) 是一种由梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*, TP) 引起的性传播性疾病,其病原体是梅毒螺旋体,属螺旋体科。梅毒螺旋体主要通过性接触、输血、创口或者胎盘等途径传播。梅毒螺旋体从感染区附近的淋巴结进入血液,播散全身,使机体几乎所有的组织及器官受累,临床表现为全身性,可分为不同临床阶段,包括一期、二期、三期和潜伏期。世界卫生组织 (WHO) 曾乐观地预言:“由于有高敏度检测方法和高效的治疗方案,梅毒是一种能够通过公共卫生措施得到成功控制的性传播性疾病”。遗憾的是,至今梅毒依然是世界范围的公共卫生问题,缺乏有效的行政控制措施,每年全球大约有 1200 万的患者,其中 60 万孕妇患者。(参见:Health Protection Agency Centre for Infections. International Encyclopedia of Public Health-Syphilis[M]. London, UK:Health Protection Agency Centre, 2008, 289-297) 事实上,梅毒的感染现状可能要比想象中的更让人悲观。

[0003] 调查发现,梅毒感染者已经较广泛地存在于普通人群中。

[0004] 梅毒螺旋体尚不能进行体外培养,梅毒诊断与流行病学调查主要依赖于血清学试验,包括特异性抗体和反应素检测两大类型。梅毒特异性抗体 IgM (TP-IgM) 和 IgG (TP-IgG) 抗体分别于 2 周和 4 周后产生,即使患者经过足够治疗,其仍能长期存在,甚至终身不消失(参见:Luis J F, Felipe U S, Santa G C, et al. Evaluation of a rapid strip and a particle agglutination tests for syphilis diagnosis[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2007, 59:123-126); 而另一种抗体物质反应素产生较晚,一般在受感染后 5~7 周产生(参见:林月圆. TPPA 和 TRUST 在梅毒诊断中的价值与临床相关问题[J]. 放射免疫学杂志, 2009, 22(3):295-297.), 而且晚期梅毒、梅毒治疗后期以及潜伏梅毒可能阴性。因此梅毒特异性抗体的阳性率、敏感性显著高于反应素。TP-IgM 是梅毒感染后,机体最先出现的特异性抗体。只要有活的梅毒螺旋体存在,其 TP-IgM 将会维持在一定的水平。Martina H 等(参见:Martina H, Daan W N, Mart M, et al. Comparison of a *Treponema pallidum* IgM immunoblot with a 19S fluorescent treponemal antibody absorption test for the diagnosis of congenital syphilis[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2007, 59:61-66.) 认为 TP-IgM 是梅毒早期感染并活动的一项血清学标志,李步荣等(参见:李步荣,贺军涛,张毅,等. 梅毒螺旋体 IgM 抗体检测的临床意义[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(16):1495-1497) 认为 TP-IgM 与 TP-DNA 一样,代表着梅毒传染性指标。在排除近期抗梅毒治疗的前提下,TP-IgM 若不转阴,提示体内可能残存梅毒螺旋体或治疗不彻底。TP-IgM 阴转者随访时再转

阳性,表明再次感染梅毒(参见:Rawstron SA, Mehta S, Bromberg K, et al. Evaluation of a Treponema pallidum specific IgM enzyme immunoassay and Treponema pallidum western blot antibody detection in the diagnosis of maternal and congenital syphilis[J]. Sex Transm Dis, 2004, 31(2):123-126)。尽管 TP-IgM 阴性不能完全排除传染性,但 TP-IgM 阳性必定提示该患者具有传染性。

[0005] 早期的血清学方法使用完整梅毒螺旋体作为抗原,研究和诊断用的 TP 是以 TP 感染兔睾丸获得,这种方法花费大、获得的 TP 量少、不纯(混有宿主蛋白),与其他病原体存在交叉反应,因此假阳性也时有发生。随着分子生物学技术的普及及梅毒螺旋体抗原的相继克隆,将重组抗原应用于梅毒实验已经越来越多。目前研究比较多的 TP 抗原有 TPN17、TPN47、TPN15、TPN44.5、TPN36、TP0453、TP0684 及 TPr 家族。采用重组 DNA 技术制备的重组抗原可以克服完整 TP 抗原的缺点,能快速、经济地制备无限量特异重组 TP 抗原。梅毒特异性抗体检测是梅毒确证试验,包括 TPHA, TPPA, ELISA, FTA-ABS 及 Western-blot 等,其特异性均较高。然而,面对严峻的防制形式,不但需要特异准确的检测手段,还需要一种更简便快捷的试剂来筛查,以便为临床和疾病防控提供对策。

发明内容

[0006] 本实用新型的目的是提供一种梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条。

[0007] 本实用新型设有第 1 试剂条和第 2 试剂条;

[0008] 第 1 试剂条设有第 1 载体板、第 1 加样垫、第 1 胶体金垫、第 1 硝酸纤维膜(NC 膜)、梅毒特异性 IgM 抗体检测线、第 1 对照线和第 1 吸收垫;第 1 加样垫、第 1 胶体金垫、第 1 硝酸纤维膜和第 1 吸收垫依次粘贴在第 1 载体板上表面,第 1 加样垫的一端设在第 1 胶体金垫的一端上,第 1 胶体金垫的另一端设在第 1 硝酸纤维膜的一端上,第 1 吸收垫的一端设在第 1 硝酸纤维膜的另一端上,梅毒特异性 IgM 抗体检测线和第 1 对照线依次设在第 1 硝酸纤维膜上;在梅毒特异性 IgM 抗体检测线处包被抗人 IgM 特异性片段 μ 链单克隆抗体,在第 1 对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体。

[0009] 第 2 试剂条设有第 2 载体板、第 2 加样垫、第 2 胶体金垫、第 2 硝酸纤维膜(NC 膜)、特异性总抗体检测线、第 2 对照线和第 2 吸收垫;第 2 加样垫、第 2 胶体金垫、第 2 硝酸纤维膜和第 2 吸收垫依次粘贴在第 2 载体板上表面,第 2 加样垫的一端设在第 2 胶体金垫的一端上,第 2 胶体金垫的另一端设在第 2 硝酸纤维膜的一端上,第 2 吸收垫的一端设在第 2 硝酸纤维膜的另一端上,特异性总抗体检测线和第 2 对照线依次设在第 2 硝酸纤维膜上;在特异性总抗体检测线处包被抗人 Ig 单克隆抗体或梅毒特异性抗原 TPN17 和 / 或梅毒特异性抗原 TPN47,在第 2 对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 IgG 抗体。

[0010] 第 1 试剂条的第 1 加样垫与第 2 试剂条的第 2 加样垫之间可用玻璃纤维膜连接,再放入试剂盒中(称单孔加样),也可以不经玻璃纤维膜连接或搭桥(称双孔加样)。

[0011] 所述第 1 载体板和第 2 载体板可采用 PVC 板。

[0012] 以下给出本实用新型的制备方法,包括以下步骤:

[0013] 1) 制备梅毒重组抗原 TPN17、TPN47

[0014] 采用基因克隆技术,PCR 扩增编码梅毒螺旋体抗原的 DNA,并插入大肠杆菌中使其

表达,得梅毒重组抗原 TPN17 和 TPN47 ;

[0015] 2) 硝酸纤维素膜的点样

[0016] 在梅毒特异性 IgM 抗体检测线上包被抗人 IgM 特异性片段 μ 链单克隆抗体,在特异性总抗体检测线处包被抗人 Ig 单克隆抗体或梅毒特异性抗原 TPN17 和 / 或梅毒特异性抗原 TPN47,晾干,所述抗人 Ig 单克隆抗体或梅毒特异性抗原 TPN17 和 / 或梅毒特异性抗原 TPN47 的浓度可为 1 ~ 4mg/mL,抗人 IgM 特异性片段 μ 链单克隆抗体的浓度可为 1 ~ 4mg/mL,羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47IgG 抗体由抗 TPN17-IgG 抗体与抗 TPN47-IgG 抗体按体积比 1 : 1 混合,其浓度为 1 ~ 4mg/mL ;三者点样量为 1 μ L/cm ;

[0017] 3) 制备胶体金

[0018] 采用柠檬酸三钠还原方法制备 25nm 胶体金,取 1% 氯金酸 1mL 加入到 100mL 去离子双蒸水中,得到的氯金酸浓度为 0.01%,置于带冷凝装置的烧瓶中加热至沸腾,磁力加热搅拌下加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 2.0mL,继续加热直至溶液呈葡萄酒色为止,冷却后置于棕色瓶中 4°C 冰箱保存备用,所述柠檬酸三钠的浓度可为 2% ;

[0019] 4) 胶体金与 TPN17、TPN47 的标记

[0020] 胶体金与梅毒特异性抗原 TPN17 的标记 :取胶体金 10mL,用 0.1mol/L NaOH 调至 pH5.4,加 100 μ g TPN17,混匀,放置 5min,加入 5% BSA 1mL 混匀,4°C、10000r/min 离心 1h,弃上清,将沉淀用 TBS 缓冲液溶解至 10mL,4°C、10000r/min 离心 1h,弃上清,沉淀用 TBS 稀释至 1mL,得胶体金标记的 TPN17 抗原。

[0021] 胶体金与梅毒特异性抗原 TPN47 的标记同上操作,得胶体金标记的 TPN47 抗原 ;

[0022] 将胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原混合后,均匀地涂于玻璃纤维膜上,烘干,制备成胶体金垫 ;

[0023] 所述将胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原混合,最好胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原以体积比 1 : (0.2 ~ 5) 混合 ;所述烘干的温度可为 37°C ;

[0024] 5) 制备免疫层析检测条

[0025] 第 1 试剂条设有第 1 载体板、第 1 加样垫、第 1 胶体金垫、第 1 硝酸纤维素膜 (NC 膜)、梅毒特异性 IgM 抗体检测线、第 1 对照线和第 1 吸收垫 ;第 1 加样垫、第 1 胶体金垫、第 1 硝酸纤维素膜和第 1 吸收垫依次粘贴在第 1 载体板上表面,第 1 加样垫的一端设在第 1 胶体金垫的一端上,第 1 胶体金垫的另一端设在第 1 硝酸纤维素膜的一端上,第 1 吸收垫的一端设在第 1 硝酸纤维素膜的另一端上,梅毒特异性 IgM 抗体检测线和第 1 对照线依次设在第 1 硝酸纤维素膜上 ;在梅毒特异性 IgM 抗体检测线处包被抗人 IgM 特异性片段 μ 链单克隆抗体,在第 1 对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体,用切条机切成条状,得梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条的第 1 试剂条 ;

[0026] 将第 2 试剂条设有第 2 载体板、第 2 加样垫、第 2 胶体金垫、第 2 硝酸纤维素膜 (NC 膜)、特异性总抗体检测线、第 2 对照线和第 2 吸收垫 ;第 2 加样垫、第 2 胶体金垫、第 2 硝酸纤维素膜和第 2 吸收垫依次粘贴在第 2 载体板上表面,第 2 加样垫的一端设在第 2 胶体金垫的一端上,第 2 胶体金垫的另一端设在第 2 硝酸纤维素膜的一端上,第 2 吸收垫的一端设在第 2 硝酸纤维素膜的另一端上,特异性总抗体检测线和第 2 对照线依次设在第 2 硝酸纤维素膜上 ;在特异性总抗体检测线处包被抗人 Ig 单克隆抗体或梅毒特异性抗原 TPN17 和 / 或梅毒

特异性抗原 TPN47, 在第 2 对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47IgG 抗体, 用切条机切成条状, 得梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条的第 2 试剂条。

[0027] 在第 1 加样垫和第 2 加样垫上可用连接膜(可采用玻璃纤维膜)将第 1 试剂条和第 2 试剂条连接(称单孔加样), 也可以不经连接膜连接或搭桥(称双孔加样), 可将梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条放入盒内, 做成检测卡, 与干燥剂一起装入铝箔袋中, 机器封口, 密封保存。

[0028] 本实用新型提供了一种采用胶体金免疫层析技术建立梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合快速检测试剂, 可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中梅毒特异性 IgM 抗体和特异性总抗体的检测。检测时所需的标本量极小, 不需要特殊仪器, 肉眼直接判读结果, 且检测简便快速, 特异性强, 灵敏度高, 准确可靠, 成本低, 应用广泛。

附图说明

[0029] 图 1 为本实用新型实施例的结构组成示意图; A 为第 1 试剂条, B 为第 2 试剂条, 1 为连接膜(可采玻璃纤维膜)。

[0030] 图 2 为本实用新型实施例的组装示意图。在图 2 中, (1) 为单孔加样组装图, (2) 为双孔加样组装图; A 为第 1 试剂条, B 为第 2 试剂条。

[0031] 图 3 为实验结果模式示意图。在图 3 中, (1) 为使用前的示意图, (2) ~ (4) 为无效试验(产品质量问题), (5) 为梅毒特异性总抗体, IgM 抗体阳性, (6) 为梅毒特异性总抗体阳性, IgM 抗体阴性; A 为第 1 试剂条, B 为第 2 试剂条; T 为检测线, C 为对照线。

具体实施方式

[0032] 以下实施例将结合附图对本实用新型作进一步的说明。

[0033] 参见图 1 和 2, 本实用新型实施例设有第 1 试剂条 A 和第 2 试剂条 B;

[0034] 第 1 试剂条 A 设有第 1 载体板 A1、第 1 加样垫 A2、第 1 胶体金垫 A3、第 1 硝酸纤维素膜(NC 膜)A4、梅毒特异性 IgM 抗体检测线 A6、第 1 对照线 A7 和第 1 吸收垫 A8; 第 1 加样垫 A2、第 1 胶体金垫 A3、第 1 硝酸纤维素膜 A4 和第 1 吸收垫 A8 依次粘贴在第 1 载体板 A1 上表面, 第 1 加样垫 A2 的一端设在第 1 胶体金垫 A3 的一端上, 第 1 胶体金垫 A3 的另一端设在第 1 硝酸纤维素膜 A4 的一端上, 第 1 吸收垫 A8 的一端设在第 1 硝酸纤维素膜 A4 的另一端上, 梅毒特异性 IgM 抗体检测线 A6 和第 1 对照线 A7 依次设在第 1 硝酸纤维素膜 A4 上; 在梅毒特异性 IgM 抗体检测线 A6 处包被抗人 IgM 特异性片段 μ 链单克隆抗体, 在第 1 对照线 A7 处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体。

[0035] 第 2 试剂条 B 设有第 2 载体板 B1、第 2 加样垫 B2、第 2 胶体金垫 B3、第 2 硝酸纤维素膜(NC 膜)B4、特异性总抗体检测线 B6、第 2 对照线 B7 和第 2 吸收垫 B8; 第 2 加样垫 B2、第 2 胶体金垫 B3、第 2 硝酸纤维素膜 B4 和第 2 吸收垫 B8 依次粘贴在第 2 载体板 B1 上表面, 第 2 加样垫 B2 的一端设在第 2 胶体金垫 B3 的一端上, 第 2 胶体金垫 B3 的另一端设在第 2 硝酸纤维素膜 B4 的一端上, 第 2 吸收垫 B8 的一端设在第 2 硝酸纤维素膜 B4 的另一端上, 特异性总抗体检测线 B6 和第 2 对照线 B7 依次设在第 2 硝酸纤维素膜 B4 上; 在特异性总抗体检测线 B6 处包被抗人 Ig 单克隆抗体或梅毒特异性抗原 TPN17 和 / 或梅毒特异性抗原 TPN47, 在第 2 对照线 B7 处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47IgG 抗体。

[0036] 第 1 试剂条 A 的第 1 加样垫 A2 与第 2 试剂条 B 的第 2 加样垫 B2 之间可用连接膜（可采用玻璃纤维膜）连接，再放入试剂盒中（称单孔加样），也可以不经连接膜连接或搭桥（称双孔加样）。

[0037] 所述第 1 载体板 A1 和第 2 载体板 B1 可采用 PVC 板。

[0038] 以下给出本实用新型实施例的制备方法，包括以下步骤：

[0039] 1) 制备梅毒重组抗原 TPN17、TPN47

[0040] 采用基因克隆技术，PCR 扩增编码梅毒螺旋体抗原的 DNA，并插入大肠杆菌中使其表达，得梅毒重组抗原 TPN17 和 TPN47。

[0041] 2) 硝酸纤维素膜的点样

[0042] 在梅毒特异性 IgM 抗体检测线上包被抗人 IgM 特异性片段 μ 链单克隆抗体，在特异性总抗体检测线处包被抗人 Ig 单克隆抗体或梅毒特异性抗原 TPN17 和 / 或梅毒特异性抗原 TPN47，晾干，所述抗人 Ig 单克隆抗体或梅毒特异性抗原 TPN17 和 / 或梅毒特异性抗原 TPN47 的浓度可为 1 ~ 4mg/mL，抗人 IgM 特异性片段 μ 链单克隆抗体的浓度可为 1 ~ 4mg/mL，羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 IgG 抗体由抗 TPN17-IgG 抗体与抗 TPN47-IgG 抗体按体积比 1 : 1 混合，其浓度为 1 ~ 4mg/mL；三者点样量为 1 μ L/cm。

[0043] 3) 制备胶体金

[0044] 采用柠檬酸三钠还原方法制备 25nm 胶体金，取 1% 氯金酸 1mL 加入到 100mL 去离子双蒸水中，得到的氯金酸浓度为 0.01%，置于带冷凝装置的烧瓶中加热至沸腾，磁力加热搅拌下加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 2.0mL，继续加热直至溶液呈葡萄酒色为止，冷却后置于棕色瓶中 4°C 冰箱保存备用，所述柠檬酸三钠的浓度可为 2%。

[0045] 4) 胶体金与 TPN17、TPN47 的标记

[0046] 胶体金与梅毒特异性抗原 TPN17 的标记：取胶体金 10mL，用 0.1mol/L NaOH 调至 pH5.4，加 100 μ g TPN17，混匀，放置 5min，加入 5% BSA 1mL 混匀，4°C、10000r/min 离心 1h，弃上清，将沉淀用 TBS 缓冲液溶解至 10mL，4°C、10000r/min 离心 1h，弃上清，沉淀用 TBS 稀释至 1mL，得胶体金标记的 TPN17 抗原。

[0047] 胶体金与梅毒特异性抗原 TPN47 的标记同上操作，得胶体金标记的 TPN47 抗原。

[0048] 将胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原混合后，均匀地涂于玻璃纤维膜上，烘干，制备成胶体金垫。

[0049] 所述将胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原混合，最好胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原以体积比 1 : (0.2 ~ 5) 混合；所述烘干的温度可为 37°C。

[0050] 5) 制备免疫层析检测条

[0051] 第 1 试剂条设有第 1 载体板、第 1 加样垫、第 1 胶体金垫、第 1 硝酸纤维素膜 (NC 膜)、梅毒特异性 IgM 抗体检测线、第 1 对照线和第 1 吸收垫；第 1 加样垫、第 1 胶体金垫、第 1 硝酸纤维素膜和第 1 吸收垫依次粘帖在第 1 载体板上表面，第 1 加样垫的一端设在第 1 胶体金垫的一端上，第 1 胶体金垫的另一端设在第 1 硝酸纤维素膜的一端上，第 1 吸收垫的一端设在第 1 硝酸纤维素膜的另一端上，梅毒特异性 IgM 抗体检测线和第 1 对照线依次设在第 1 硝酸纤维素膜上；在梅毒特异性 IgM 抗体检测线处包被抗人 IgM 特异性片段 μ 链单克隆抗体，在第 1 对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体，用切条机切成条状，得梅毒特

异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条的第 1 试剂条；

[0052] 将第 2 试剂条设有第 2 载体板、第 2 加样垫、第 2 胶体金垫、第 2 硝酸纤维膜 (NC 膜)、特异性总抗体检测线、第 2 对照线和第 2 吸收垫；第 2 加样垫、第 2 胶体金垫、第 2 硝酸纤维膜和第 2 吸收垫依次粘贴在第 2 载体板上表面，第 2 加样垫的一端设在第 2 胶体金垫的一端上，第 2 胶体金垫的另一端设在第 2 硝酸纤维膜的一端上，第 2 吸收垫的一端设在第 2 硝酸纤维膜的另一端上，特异性总抗体检测线和第 2 对照线依次设在第 2 硝酸纤维膜上；在特异性总抗体检测线处包被抗人 Ig 单克隆抗体或梅毒特异性抗原 TPN17 和 / 或梅毒特异性抗原 TPN47，在第 2 对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47IgG 抗体，用切条机切成条状，得梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条的第 2 试剂条。

[0053] 再用连接膜（可采用玻璃纤维膜）在第 1 加样垫和第 2 加样垫处将第 1 试剂条和第 2 试剂条连接（称单孔加样），也可以不经连接膜连接或搭桥（称双孔加样），可将梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条放入盒内，做成检测卡，与干燥剂一起装入铝箔袋中，机器封口，密封保存。

[0054] 以下给出免疫层析法检测患者的临床标本：

[0055] 取稀释待检标本（全血、血清、血浆、脑脊液）120 μ L，加样于免疫层析检测条样品处（单孔加样），静置 20min 观察结果；或各取稀释待检标本（全血、血清、血浆、脑脊液）60 μ L，加样于梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条样品处（双孔加样），静置 20min 观察结果。只在两条梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条对照区各有一紫红色条带出现，则判为阴性；在两梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条的检测区 T 及对照区 C 均有一紫红色条带出现，则判为阳性；加样检测后，检测区和对照区均不出现紫红色条带，为无效结果（见图 3）。其中，待检标本（全血、血清、血浆、脑脊液）稀释液采用生理盐水，稀释倍数 0 ~ 50 倍。

[0056] 以下给出梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条性能检定：

[0057] 1) 外观检查：白色包被反应膜平整、干净无污染斑点、无裂缝，胶带无开胶，无切割现象。

[0058] 2) 阳性标本符合率：用 TP-IgM 和梅毒特异性总抗体的不同滴度的阳性参比血清各 50 份采用梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条检定，计算阳性符合率。梅毒特异性总抗体的阳性参比血清采用采用 TPPA（日本富士株式会社）法确定，TP-IgM 抗体的阳性参比血清采用采用 FTA-ABS（德国欧蒙公司）法确定。

[0059] 3) 阴性标本符合率：用 50 份阴性参比血清检定，计算阳性符合率。梅毒特异性总抗体的阴性参比血清的确定采用 TPPA（日本富士株式会社）法，TP-IgM 抗体的阴性参比血清采用采用 FTA-ABS（德国欧蒙公司）法确定。

[0060] 4) 灵敏度检测：用卫生部室内质控血清检测，最低检出限度应小于或等于 4NCU/mL，与 TPPA（日本富士株式会社）相当。

[0061] 5) 批内差异：同一批次梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条，用特征性血清检测，要求阳性血清检测结果显示色带的颜色深浅一致，阴性血清检测的结果阴性。

[0062] 6) 批间差异：不同批次梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条，用特征性血清检测，要求阳性血清检测结果显示色带的颜色深浅一致，阴性血清检测的结果

阴性。

[0063] 7) 干扰试验 :检测结果不受标本溶血 (n = 50)、脂血 (n = 50) 和黄疸 (n = 50) 的干扰。血清 (或血浆) 来自本申请人临床标本。

[0064] 8) 交叉反应 :采用梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条,进行系统性红斑狼疮 (n = 30)、类风湿病 (n = 30)、免疫性肝炎 (n = 30) 等自身免疫系统疾病的检测,未发现交叉反应。自身免疫系统疾病的血清来自本申请人临床确诊患者。

[0065] 9) 稳定性检测 :应用 Arrhenius 法则,将梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条放置 37℃ 20 天后检测,以上各项指标无显著变化,确保成品在室温干燥条件下保存,有效期为 18 个月。

[0066] 以下给出具体实施例。

[0067] 实施例 1

[0068] 第 1 试剂条 A 在硝酸纤维素膜 (NC 膜) IgM 检测线上包被抗人 IgM 特异性片段 μ 链单克隆抗体,第 2 试剂条 B 的特异性总抗体检测线上包被抗人 Ig 单克隆抗体,在对照线处 C 包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 抗体,室温晾干,密封室温保存备用。其中,抗人 IgM 特异性片段 μ 链单克隆抗体、抗人 Ig 单克隆抗体的浓度为 1mg/mL,羊抗梅毒抗原 (TPN17 和 TPN47) IgG 抗体由抗 TPN17-IgG 抗体与抗 TPN47-IgG 抗体按体积比 1 : 1 混合,其终浓度为 1mg/mL ;三者点样量为 1 μ L/cm。

[0069] 将已纯化的金标记的梅毒重组抗原 TPN17 和 TPN47 以体积比 1 : 1 混合后,均匀地涂于玻璃纤维纸上,在 37℃ 烘干,制备成金胶体垫,密封备用。将固相化的纤维膜与胶体金结合的玻璃纤维、吸水纸等按一定顺序,通过 PVC 不干胶底板组合在一起,用切条机切成一定宽度检测条。再用玻璃纤维纸在加样垫处将第 1 试剂条和第 2 试剂条连接。或将第 1 试剂条和第 2 试剂条放入相应规格的塑料盒内,做成检测卡。把梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条或检测试剂盒与干燥剂一起装入铝箔袋中,机器封口,密封保存。

[0070] 取 1 : 10 稀释的待检标本血清 120 μ L,加样于梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条加样区,静置 20min 观察结果。只在梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合检测试剂条对照区有一紫红色条带出现,则判为阴性 ;在检测区及对照区均有一紫红色条带出现,则判为阳性 ;加样检测后,检测区 T 和对照区 C 均不出现紫红色条带,为无效结果。(参见图 3)

[0071] 实施例 2

[0072] 与实施例 1 相似,区别在于金胶体垫、梅毒特异性总抗体检测线仅由 TPN17 组成,不含有 TPN47。结果判断与实施例 1 相同。

[0073] 实施例 3

[0074] 与实施例 1 相似,区别在于金胶体垫、梅毒特异性总抗体检测线仅由 TPN47 组成,不含有 TPN17。结果判断与实施例 1 相同。

[0075] 实施例 4

[0076] 与实施例 1 相似,区别在于待检标本为脑脊液标本,结果判断与实施例 1 相同。

[0077] 实施例 4

[0078] 性能验证试验 :按实施例 1 的方案制备梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合快速检测试剂条,然后进行性能验证。

[0079] 1) 外观检查 :白色包被反应膜平整、干净无污染斑点、无裂缝,胶带无开胶,梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合快速检测试剂条宽度在 3 ± 0.1 mm,无切斜现象。

[0080] 2) 阳性标本符合率 :50 份经 FTA-ABS(德国欧蒙公司)检测确定的 TP-IgM 阳性参比血清,采用梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合快速检测试剂条检出 TP-IgM 阳性 50 份,阳性标本符合率 100%;而 50 份经梅毒螺旋体特异性抗体明胶凝集试验 (TPPA)(日本富士株式会社)检测确定的梅毒特异性总抗体阳性参比血清,采用梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合快速检测试剂条检出梅毒特异性抗体 49 份,阳性标本符合率 98%。

[0081] 3) 阴性标本符合率 :50 份经 FTA-ABS(德国欧蒙公司)检测确定的 TP-IgM 阴性参比血清,采用梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合快速检测试剂条检出 TP-IgM 阴性 50 份,阴性标本符合率 100%;而 50 份经梅毒螺旋体特异性抗体明胶凝集试验 (TPPA)(日本富士株式会社)检测确定的梅毒特异性总抗体阴性参比血清,采用梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合快速检测试剂条检出梅毒特异性抗体 50 份,阴性标本符合率 100%。

[0082] 4) 灵敏度检测 :用卫生部室内质控血清(批号 :200902001)检测,最低检出限度 4NCU/mL。

[0083] 5) 批内差异 :同一批次梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合快速检测试剂条,用特征性阳性血清(高、中、低血清)检测,相同滴度检测结果显示色带的颜色深浅一致,阴性血清检测的结果阴性。

[0084] 6) 批间差异 :不同批次梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合快速检测试剂条,用特征性阳性血清(高、中、低血清)检测,相同滴度检测结果显示色带的颜色深浅一致,阴性血清检测的结果阴性。

[0085] 7) 干扰试验 :检测结果不受标本溶血 ($n = 50$)、脂血 ($n = 50$) 和黄疸 ($n = 50$) 的干扰。

[0086] 8) 交叉反应 :采用梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合快速检测试剂条或检测盒,进行系统性红斑狼疮 ($n = 30$)、类风湿病 ($n = 38$)、免疫性肝炎 ($n = 40$) 等自身免疫系统疾病的检测,未发现交叉反应。

[0087] 9) 稳定性检测 :将梅毒特异性 IgM 抗体与特异性总抗体联合快速检测试剂条放置 37°C 20 天后检测,以上各项指标无显著变化。

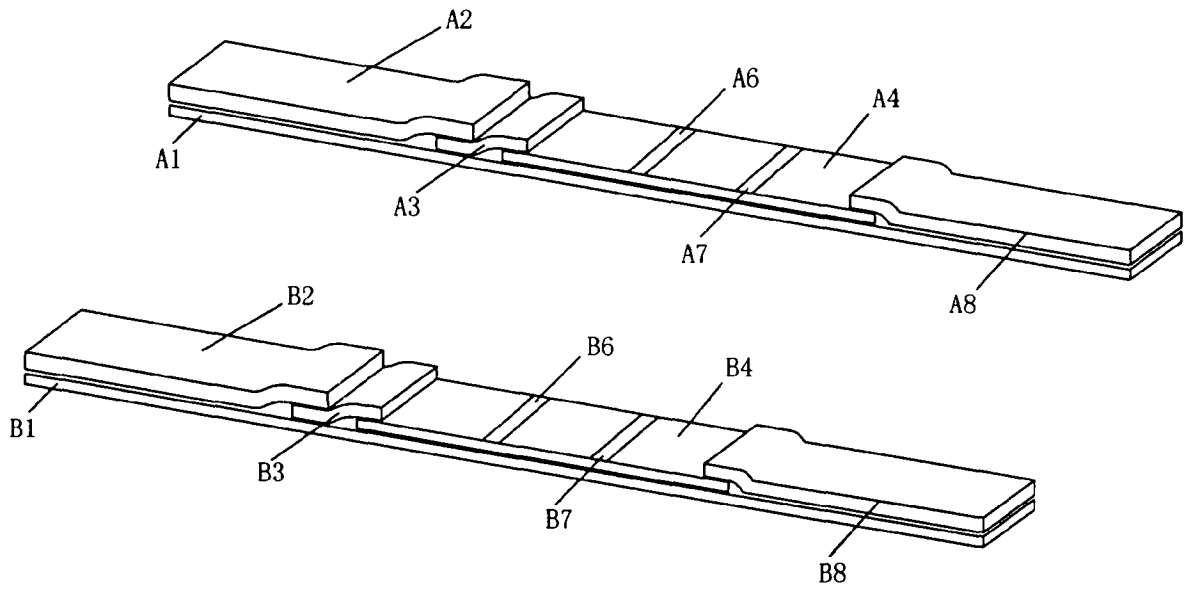


图 1

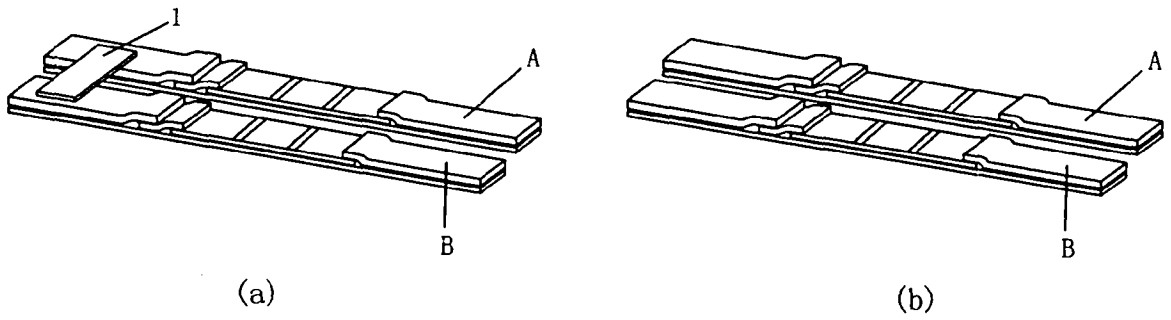


图 2

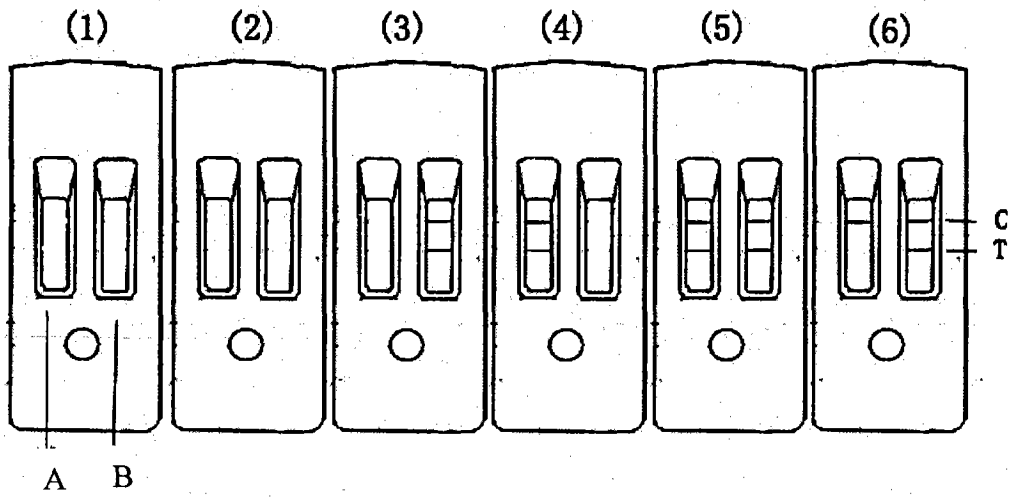


图 3

专利名称(译)	梅毒特异性IgM抗体与特异性总抗体联合检测试剂条		
公开(公告)号	CN201697920U	公开(公告)日	2011-01-05
申请号	CN201020198882.4	申请日	2010-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
[标]发明人	张忠英 林丽蓉 杨天赐 张长弓		
发明人	张忠英 林丽蓉 杨天赐 张长弓		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/571		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

梅毒特异性IgM抗体与特异性总抗体联合检测试剂条，涉及一种梅毒特异性IgM抗体与特异性总抗体联合检测试剂。设有2条试剂条，2条试剂条均设有载体板、加样垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、对照线和吸收垫；第1、2条试剂条分别设有梅毒特异性IgM抗体检测线和特异性总抗体检测线。制备梅毒重组抗原TPN17、TPN47；硝酸纤维素膜的点样；制备胶体金；胶体金与TPN17、TPN47的标记；制备免疫层析检测条。可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中梅毒特异性IgM抗体和特异性总抗体的检测。检测时标本量极小，不需特殊仪器，肉眼直接判读结果，检测简便快速，特异性强，灵敏度高，准确可靠，成本低，应用广泛。

